ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ КЛЕТОК МОНОЦИТАРНОГО РЯДА В ЛЕЧЕНИИ БОЛЬНЫХ КРИТИЧЕСКОЙ ИШЕМИЕЙ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ

Зубова Е.С.¹, Вавилов В.Н.¹, Артюшин Б.С.^{1,2}, Мовчан К.Н.³, Крутиков А.Н.¹,
Романенков Н.С.³, Исхаков Р.Б.³

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова», Санкт-Петербург, e-mail: ZubovaElS@gmail.com;

²ФГБОУ ВО «Новгородский государственный университет имени Ярослава Мудрого», Великий Новгород, e-mail: artyushin_boris@mail.ru;

³ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, e-mail: movchank@miac.zdrav.spb.ru

Необходимость решения непростых задач по оказанию медицинской помощи (МП) больным критической ишемией нижних конечностей (КИНК) сохраняется. При выраженной коморбидности таких пациентов и, как следствие, ограниченных перспективах хирургической реконструкции сосудов, в качестве альтернативы прямой реваскуляризации НК особые надежды возлагаются на потенциал клеточной терапии (КлТ). Проанализированы результаты оказания МП 53 больным КИНК при использовании в комплексе их лечения биосубстанций, содержащих моноцитарные клетки костного мозга (МК КМ), с 2010 по 2014 г. Возраст пациентов колебался в пределах 49-85 лет. Сопутствующие заболевания констатированы у 100% больных, наиболее часто – патология сердца (62,3%). Сформированы две группы пациентов: больным I группы проводилась КлТ (КлТ-группа); во II – в мягкие ткани НК вводилось плацебо (Плцб-группа). На фоне комплексного лечения пациентов в течение 12 мес. НК удалось сохранить у 24 (67,7%) из 36 больных КИНК КлТ-группы. Ампутация НК (АНК) выполнена в 8 (22%) случаях. Умерли 4 (11%) пациента. В Плцб-группе больных КИНК АНК осуществлена 2 (11,8%) пациентам (сохранена в 15 (88,2%) случаях). В течение 5 лет наблюдения за больными КлТ-группы НК сохранены в 20 (56%) случаях (в 9 наблюдениях (25%) выполнены высокие АНК). Показатель частоты летальных исходов составил 19% (7 случаев). В ряде случаев клинически наблюдаемое улучшение течения КИНК не сопровождалось повышением лодыжечного АД, что позволяет судить о неоднозначности механизмов, обеспечивающих положительный эффект КлТ. Данные использования МК КМ при оказании МП пациентам с КИНК позволяют считать, что КлТ – эффективный компонент улучшения результатов лечения. Целесообразность дальнейшего целенаправленного изучения механизмов как позитивного, так и негативного воздействия МК КМ на организм больных КИНК несомненна.

Ключевые слова: атеросклероз, критическая ишемия нижних конечностей, ангиография, клеточная терапия, стволовые кроветворные клетки.

POSSIBILITIES OF THE APPLICATION OF HEMOPOETIC CELLS OF MONOCYTARY SERIES IN THE TREATMENT OF PATIENTS WITH CRITICAL LIMB ISCHEMIA

Zubova E.S.¹, Vavilov V.N.¹, Artyushin B.S.^{1,2}, Movchan K.N.³, Krutikov A.N.¹,
Romanenkov N.S.³, Iskhakov R.B.³

¹Almazov National Medical Research Center, Saint-Petersburg, e-mail: ZubovaElS@gmail.com;

²Yaroslav-the-Wise Novgorod State University, Velikiy Novgorod, e-mail: artyushin_boris@mail.ru;

³North-Western State Medical University n.a. I.I. Mechnikov, Saint-Petersburg, e-mail: movchank@miac.zdrav.spb.ru

There are still a lot of difficulties in treating critical limb ischemia patients. Such patients usually have high comorbidity and therefore have limitations for surgery. Cell therapy is meant to be an alternative for them. The article analyzes results of treating critical limb ischemia patients with help of biosubstances of blood stem cells in 2010 - 2014. Age range was 49 - 85. All patients (100%) had comorbidity, in most cases - cardiac diseases (62.3%). There were two groups: 1st group underwent cell therapy, 2nd group received placebo. During follow-up of 12 months in the 1st group 24 of 36 patients (67.7%) had saved their limbs, there were 8 (22%) amputations and 4 (11%) deaths. There were 15 saved limbs (88.2%) and 2 amputations (11.8%) in the 2nd group. After 5 years follow-up in the 1st group 20 (56%) patients had saved their limbs and 9 (25%) underwent high amputations. Mortality rate was 19% (7 cases). In some cases improving of clinical state in CLI patients did not raise ankle-brachial index which considers ambiguous mechanisms of cell therapy positive effect. Data of

using blood stem cells for treating CLI patients affords to submit cell therapy as effective component for better treatment. Further investigations of positive and negative mechanisms of blood stem cells in CLI patients are needed.

Keywords: atherosclerosis, critical limb ischemia, angiography, cell therapy, blood stem cells.

Актуальность. Хроническая ишемия нижних конечностей (ХИНК) обусловливается окклюзирующим атеросклерозом (ОА) их сосудов, макрососудистыми осложнениями сахарного диабета (в частности, при синдроме диабетической стопы) и облитерирующим тромбангиитом [1]. Распространенность ХИНК в развитых странах мира значительна – это состояние выявляется почти у 3% населения, среди них в 5% случаев сосудистая недостаточность НК в течение года приобретает черты критического заболевания – КИНК [2]. Лечение больных КИНК оказывается сложной и пока еще во многом нерешенной проблемой медицины в целом, и сосудистой хирургии (СХ) в частности [3]. Среди многообразия технологий оказания МП пациентам с КИНК базисным методом выбора большинство специалистов по СХ считает прямую реваскуляризацию НК [4]. В связи с высокой частотой поражения дистальных отделов сосудистого русла НК их прямая реваскуляризация оказывается выполнимой только в 35–55% наблюдений пациентов с КИНК, а в группе больных, возраст которых превышает 70 лет, – в 25% случаев [5]. На терминальных стадиях патологии возможности консервативного лечения, как правило, считаются исчерпанными или бесперспективными [6]. Почти в 40% случаев КИНК у пациентов, которым осуществлялось сугубо консервативное лечение, в течение года возникает необходимость в качестве операции отчаяния проводить ампутацию пораженной НК (АНК) [7].

Альтернатива хирургической реваскуляризации при КИНК некоторыми исследователями увязывается с появившимися в последнее время возможностями воздействия на процессы регенерации сосудистого русла НК посредством применения препаратов, содержащих гемопоэтические клетки (ГК), свойства которых в плане стимуляции формирования новых капилляров и ремоделирования строения существующих коллатеральных артериальных сосудов с увеличением их диаметра и пропускной способности кровотока [8]. В этом ракурсе проведено немало экспериментальных исследований на животных с оценкой возможностей использования разных типов ГК, с определенной констатацией эффективности клеточной терапии – КлТ [9]. Однако данные о результатах клинической апробации наработок фундаментальных исследований пока не столь многочисленны и оказываются неоднозначными [8]. К настоящему времени опубликованы результаты деятельности ряда клиницистов об эффективности КлТ у больных ХИНК [10]. Большинство авторов сообщает об успехе применения КлТ у пациентов с ХИНК

независимо от вида использованных клеточных элементов (собственно мезенхимные клетки, мононуклеары, стимуляторы неоангиогенеза и т.п.), при этом внимание не акцентируется на преимуществах технологий введения препаратов в организм внутриаптериально, внутримышечно или посредством других технологий [11]. Обнадёживающие результаты использования КЛТ в случаях лечения больных ХИНК отмечаются как при II, так и в III–IV стадиях заболевания по Покровскому–Фонтейну [12]. Данные большинства исследователей позволяют демонстрировать положительный эффект в плане заживления трофических язвенно-некротических изменений в мягких тканях НК, уменьшение болевых ощущений в ногах в покое, улучшение показателей ряда специальных методов оценки состояния кровотока. Критические сведения о реальности предотвращения АНК, используя ГК при КИНК, приводятся только в работе изучавших динамику состояния кровотока в ногах в течение 6 месяцев от начала проведения КЛТ Lu D. и соавт. (2011) [13]. В плацебо-контролируемом пилотном исследовании «A Randomized-Start, Placebo-Controlled Pilot Trial» (PROVASA) D.H. Walter и соавт. сообщают, что число случаев АНК в группе больных, которым целенаправленно проводилась КЛТ, коррелировало с аналогичным показателем в контрольной группе. Тем не менее PROVASA – исследование знаковое в плане выделения при КИНК трех детерминант эффективности КЛТ препаратами мононуклеарных клеток костного мозга (МККМ): количественные параметры вводимых ГК, их ангиорегенераторные способности, обоснование необходимости повторного введения суспензии клеток [14]. В настоящее время доминирующей гипотезой, объясняющей положительные регенеративные эффекты трансплантированных ГК, считается т.н. паракринная теория [15]. Согласно ей, возможности восстановления сосудистого русла обуславливаются активацией резидентных ГК в т.н. васкулогенной зоне артерий цитокинами, хемокинами и факторами роста, выделяемыми имплантируемыми в ткани НК клетками [16]. В связи с этим исследование ангиорегенераторного потенциала ГК, вводимых в организм людей, больных КИНК, несомненно, актуально не только с точки зрения фундаментальной науки, но и клинической практики [10].

С 2003 г. исследования активности ГК *in vitro* сопряжены с применением теста по количественной оценке образования колоний Хилла (скоплений клеток периферической крови моноцитарного происхождения) в связи с обнаружением значимой корреляции числа этих образующихся колоний и риска развития заболеваний сердца и сосудов [16].

В целом изучение ангиорегенераторных свойств МККМ в плане устранения состояния КИНК представляет особый клинический интерес [8; 10; 12]. Этот вид биоткани, как следует из данных фундаментальных исследований, обладает выраженной активностью, вырабатывая проангиогенные факторы [15]. Интерес к МККМ также обуславливается

относительной несложностью их получения.

Таким образом, мнения авторов о возможностях КЛТ при оказании МП больным КИНК неоднозначны. Несмотря на то что за последние 10 лет количество публикаций по этому вопросу существенно увеличилось, большинство из них носит экспериментальный или обзорный характер. Это побуждает к целенаправленному изучению использования у больных КИНК технологий КЛТ.

Цель исследования: оценить ангиогенный потенциал биосубстанций, содержащих моноклеарные клетки костного мозга, при лечении больных КИНК.

Материалы и методы исследования. С 2010 по 2014 г. в отделение сосудистой хирургии (ОСХ) НМИЦ им. В.А. Алмазова госпитализированы 53 пациента с КИНК для целенаправленного воздействия на патологическое состояние посредством технологий клеточной терапии (КЛТ). Большинство (88,5%) больных составили мужчины. Возраст пациентов колебался от 49 до 85 лет (в среднем 64,8). Удельный вес контингента пациентов пожилого и старческого возраста достигал 77% наблюдений (таблица 1).

Таблица 1

Распределение пациентов НМИЦ им. В.А. Алмазова с КИНК
с учетом гендерных и возрастных характеристик

Возрастные группы	Число больных		Всего
	мужчин	женщин	
до 60 лет	12	1	13
> 61 года	35	5	40
Всего	47	6	53

Клинические наблюдения включались в исследование на основании следующих критериев: признаки ишемии НК III и IV стадии по Покровскому-Фонтейну; утрата возможности хирургической реваскуляризации НК; снижение показателей лодыжечно-плечевого индекса (ЛПИ) на пораженной НК менее 0,5; снижение показателя лодыжечного артериального давления (ЛАД) менее 40 мм рт. ст.; проходимость аорто-подвздошных сегментов артериальных сосудов с возможной окклюзией поверхностной бедренной (ПБА) или подколенной артерии (ПКА); атеросклеротическое поражение (без учета степени) артерий голени; отсутствие противопоказаний к проведению стандартной т.н. базисной консервативной терапии.

Из исследования исключались случаи с клинически значимой сопутствующей патологией (активные инфекционные процессы, перенесение инфаркта миокарда или инсульта менее годичной давности, выраженные степени сердечно-сосудистой, дыхательной, почечной недостаточности; текущие и предшествующие (в течение последних 5 лет) онкологические заболевания; алкогольная и наркотическая зависимость); поливалентной

аллергией, гиперчувствительностью к компонентам препаратов, вводимых в организм пациентов в процессе трансплантации или при инструментальном исследовании; положительными результатами тестов на вирус иммунодефицита (HIV1 или HIV2), типы гепатитов В (HBV) и С (HCV); резистентной артериальной гипертензией или системной гипотензией; отказом или неспособностью пациента представить информированное согласие на аргументированно рекомендуемый ему формат лечения.

Из исследования также исключались пациенты в случае необходимости радикальной коррекции тактики лечения.

Точками конечных результатов исследования считались:

первично: оценка безопасности применения КЛТ; количественные параметры подверженности пациентов АНК, выполненных в течение 5 лет наблюдения за пациентами; степени градации выраженности болевых ощущений в НК в покое; устойчивость ремиссии при заживлении трофических язв;

вторично: динамика в показателях перфузии НК (на основании оценки параметров объемного кровотока по артериям НК, транскутанного напряжения кислорода (TcO_2), лодыжечного и пальцевого АД); изменения в величинах дистанции безболевой ходьбы (ДБХ); динамика плотности сосудистой коллатеральной сети; тенденции (позитивные/негативные) в уровне качества жизни.

Методом случайной выборки рандомизированы 2 группы пациентов: в одну группу включены больные, лечение которых осуществлялось с имплантацией МККМ в мягкие ткани НК. Пациентам другой группы в эти же зоны ног вводилось плацебо. Общее количество наблюдений составило 53 (36 и 17 в группах соответственно). Гендерные и возрастные характеристики пациентов сравниваемых групп сопоставимы (таблица 2).

Таблица 2

Распределение пациентов, получавших КЛТ и плацебо,
с учетом гендерных и возрастных характеристик

Режимы лечебных действий	Возраст пациентов	Число больных		Всего (средний возраст)
		мужчин	женщин	
КЛТ	до 60 лет	7	25	32
	> 61 года	1	3	4
	всего	8	28	36 (64,6)
Введение плацебо	до 60 лет	5	10	15
	> 61 года		2	2
	всего	5	12	17 (65,6)

Количество наблюдений хронической артериальной недостаточности (ХАН) III и IV стадий по Покровскому-Фонтейну составило, соответственно, 35 и 18.

При IV ст. ХАН НК сроки существования у пациентов активных трофических

дефектов мягких тканей не превышала 12 мес. (таблица 3).

Таблица 3

Распределение наблюдений КИНК IV ст. с учетом сроков активности
язвенно-некротических трофических изменений на ногах

Длительность активности существования язвенно-некротических изменений на НК, мес.	Количество наблюдений в группах пациентов, получавших		
	КлТ	плацебо	всего
1-2	2	2	4
3-6	9	1	10
6-12	3	1	4
Всего	14	4	18

Среди сопутствующих заболеваний ведущей оказывалась патология сердца, в частности его ишемическая болезнь (ИБС) верифицирована у 33 из 53 пациентов. Цереброваскулярная болезнь констатирована в 22 наблюдениях. Сахарный диабет выявлен у 5 больных (таблица 4).

Таблица 4

Распределение наблюдений восстановления кровотока в НК при КИНК
консервативными методами с учетом сопутствующей патологии

Сопутствующие заболевания*	Число случаев применения	
	КлТ (n=36)	плацебо (n=17)
Систем		
сердечно-сосудистой	32	17
эндокринной	7	3
нервной	15	9
пищеварительной	20	11
дыхательной	10	6
выделительной	7	2
венозной	6	3
опорно-двигательной	8	1
половой	5	3
Другие	7	2

* Несколько сопутствующих заболеваний отмечалось у 50 пациентов.

Курением чаще злоупотребляли пациенты, проходившие курс КлТ, чем больные, получавшие плацебо: 34 (94,4%) и 1 (5,9%) наблюдения соответственно.

Сведения о хирургических вмешательствах, выполненных на артериях НК ранее, позволили согласиться с мнением специалистов о неблагоприятном фоне как в плане системного поражения атеросклеротическим процессом, так и в понимании отказа от повторных попыток реваскуляризации НК. Восстановление кровотока в контралатеральной НК в анамнезе выполнялось 21 пациенту, некоторым больным – неоднократно. Поэтому общее число выполненных операций составило 31.

Реваскуляризация ипсилатеральной НК в анамнезе до проведения КЛТ осуществлялась 33 пациентам, в 19 наблюдениях больные госпитализированы в ОСХ НМИЦ им. В.А. Алмазова без предшествовавших попыток восстановления кровотока в НК (рисунок 1).

Рис. 1. Распределение пациентов с учетом количества операций, выполненных в анамнезе на ипсилатеральной НК

Сосудистые реконструкции на пораженной НК, выполненные пациентам в анамнезе, представлены в таблице 5.

Таблица 5

Виды операций, выполненных пациентам НМИЦ им. В.А. Алмазова на ипсилатеральной НК до целенаправленного консервативного лечения КИНК

Операции, выполненные на артериальном русле ипсилатеральной НК	Число наблюдений в группах	
	КЛТ (n=36)	плацебо (n=17)
Типичные на сегментах	31	12
<i>а о р т о – п о д в з д о ш н о м</i>	<i>15</i>	<i>10</i>
аорто-бедренное бифуркационное шунтирование (АББШ)	6	
аорто-бедренное шунтирование	1	2
полузакрытая петлевая эндартерэктомия (ППЭАЭ) из подвздошных артерий	6	5
реконструкция подвздошно-бедренного сегмента	2	3
<i>б е д р е н н о – п о д к о л е н н о м</i>	<i>16</i>	<i>2</i>
ППЭАЭ		
выше щели коленного сустава (КС)	1	1
ниже щели КС	3	
без уточнения	2	
бедренно-подколенное шунтирование (БПШ)	5	
бедренно-тибиальное шунтирование аутовеной	2	

тромбэктомия из поверхностной бедренной артерии подколенной артерии (ПкА) в сочетании с пластикой артерий голени баллонная ангиопластика поверхностной бедренной артерии (ПБА), ПкА, артерий голени	3 2 1	1
Атипичные	9	2
<i>Тромбэктомия из</i>	<i>7</i>	<i>1</i>
протеза АБ(Б)Ш и аорты:	6	
бедренно-подколенного шунта	1	
<i>протезо-подколенное шунтирование</i>	<i>1</i>	<i>1</i>
<i>повторное БПШ ниже уровня щели КС протезом</i>	<i>1</i>	
Другие	6	
Всего	46	14

У всех пациентов при госпитализации в НМИЦ оценивались показатели клинического анализа крови и мочи, коагуло- и липидограммы, уровень С-реактивного белка, выполнялся биохимический анализ крови. На этапе стационарного лечения в 100% наблюдений осуществлялся забор сыворотки крови для определения уровня цито- и хемокинов, значимых в ангиогенезе (эндотелиального фактора роста (vascular endothelial growth factor) – VEGF, гепатоцитарного фактора роста (hepatocyte growth factor) – HGF, фактора роста фибробластов (basic fibroblast growth factor) – bFGF). Обязательно выполнялся тредмил-тест с одновременной регистрацией ТсрО₂ в НК (исследуемые точки на голени), мультиспиральная компьютерная томография в сосудистом режиме (МСКТ-ангиография).

Таким образом, численность контингента пациентов, которым осуществлялась КЛТ, составила более 50 человек, что позволяет рассчитывать на методическую и статистическую корректность исследования. Наряду с недвусмысленными критериями отбора в группу кандидатов на трансплантацию МККМ выявлены особенности, обусловленные тяжелым коморбидным фоном и отягощенным анамнезом пациентов с терминальными стадиями ОА. Особенностью всех пациентов оказывалась констатация факта бесперспективности выполнения им сосудистых реконструкций т.н. традиционными методами, а также отсутствия какого-либо эффекта от всех других возможных технологий устранения КИНК консервативными методами. Данные обстоятельства обуславливали необходимость апробации технологий, в том числе и экспериментальной направленности.

Методика ведения пациентов на этапе госпитализации для проведения КЛТ и после выписки из стационара

Во время обследования больные осуществляли прием назначенных им ранее препаратов лечебного комплекса устранения КИНК (инфузионная внутривенная терапия реополиглюкином, пероральный прием статинов, препаратов аспирина или клопидогреля,

пентоксифиллина, инфузии вазопростана, симптоматическая терапия при болевом синдроме в НК в покое).

Для выделения МККМ под местной анестезией в зоне гребня пунктировалась одна из подвздошных костей. Аспирировалось 100-150 мл костного мозга (КМ). Выделение МККМ осуществлялось с помощью «Стабизола» (гидроксиэтилкрахмала) по методике А. Воуин (1968). В итоге объем концентрата МККМ составлял 50 мл (30 млн МККМ на 1 мл). Из полученной гемосодержащей суспензии забирался 1 мл биосубстрата для определения количества CD34+ клеток, 1 мл – для исследования их функциональной активности (культивирование). «Излишки» МККМ криоконсервировались и хранились в условиях НИЛ трансфузиологии и эфферентной терапии НМИЦ им. В.А. Алмазова.

Транспортировка пластиковых пакетов с клеточной массой осуществлялась в перевозных контейнерах при температуре от +10 до +25 °С.

Сепарированные МККМ в день их выделения (через 3-4 часа после забора) вводились в мышцы голени (или голени и бедра): 40 инъекций на глубину 1,0-1,5 см, отстоящих друг от друга на расстоянии 1,0-1,5 см, с объемом 1 мл клеточной суспензии на каждую точку введения.

Методика оценки эффективности КЛТ

Пациенты осматривались через 1, 6, 12 мес. после трансплантации МККМ. Далее состояние больных оценивалось 1 раз в 12 мес. Сроки наблюдения за пациентами составили от 1 до 84 мес. (в среднем – 5 лет).

При клинической оценке результатов КЛТ особое внимание придавалось частоте случаев развития осложнений в зоне введения клеточных элементов, динамике увеличения дистанции безболевой ходьбы, наличию болей в покое, частоте ампутаций НК, динамике трофических изменений, а также качеству жизни (на основании шкалы SF-36 v 2). Оценка КЛТ посредством специальных исследований осуществлялась при проведении: тредмил-теста (Skinner-Gardner протокол), исследования TcO₂, магнитно-резонансной томографии в сосудистом режиме или МСКТ-ангиографии, определения лодыжечного и пальцевого артериального давления (АД), УЗИ (цветного дуплексного сканирования в сочетании с доплерографией), оценки эндотелиальной дисфункции.

Оценку состояния кровотока в НК проводили, используя критерии их ишемии по Покровскому-Фонтейну. Для определения ЛПИ с помощью стандартной манжеты на лодыжке и на плече оценивалось АД, их отношение (в норме > 1,0). Увеличение ЛПИ более чем на 0,1 расценивалось как улучшение. TcO₂ определялось с использованием оксимонитора (PO-850, Sumitomo-Hightechs, Токио, Япония). ЛПИ, TcO₂ и дистанция безболевой ходьбы измерялись отдельно три раза в течение 10 дней до имплантации МККМ.

МСКТ-ангиография выполнялась за 1 неделю до и через 4 недели после имплантации МККМ. Протокол исследования был стандартный. Новые коллатеральные сосуды оценивались как +0 (без развития коллатералей), +1 (незначительное), +2 (умеренное) или +3 (интенсивное).

Сравнение ангиогенного потенциала ГК и их субпопуляций у пациентов с КИНК и здоровых доноров сходного возраста осуществлялось *in vitro*.

Методики статистической обработки данных

Достоверность различий динамических изменений параметрических и непараметрических клиничко-лабораторных и инструментальных показателей определялась с использованием пакетов статистических программ Statistica 12.0, Microsoft Excel, использовались методы параметрической и непараметрической статистики.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты

Общее распределение пациентов НМИЦ им. В.А. Алмазова с учетом стадии патологического процесса в группах исследования с отражением гендерных характеристик представлено в таблице 6.

Таблица 6

Распределение пациентов НМИЦ, госпитализированных для консервативного устранения ишемии НК, с учетом стадий процесса и их гендерных характеристик

Гендерные категории	Число наблюдений КИНК (в группах КЛТ/Плцб) при стадиях		Всего
	III	IV	
	КЛТ/плацебо	КЛТ/плацебо	
мужчины (n=46)	20 / 11	12 / 4	47
женщины (n=6)	2 / 2	2 / -	6
Всего	35	18	53

При госпитализации в НМИЦ им. В.А. Алмазова для лечения с использованием КЛТ у всех больных КИНК III-IV стадии по Покровскому-Фонтейну отмечались бледность кожных покровов ног и снижение их температуры с признаками слабого заполнения поверхностных вен в нижней трети голени и на стопах. У 18 пациентов с IV стадией по Покровскому-Фонтейну (14 в группе больных, получавших КЛТ, 4 – в группе, в которой использовалось плацебо) на стопах определялись трофические изменения разной степени выраженности: от участков мацерации, очаговых некрозов на пальцах и тыльных поверхностях стоп, пятках (размерами 1х1 см и более) до тотального омертвения пальцев, незаживающих язв размерами от 2х3 до 4х8 см (таблица 7).

Таблица 7

Распределение пациентов с учетом выраженности

трофических изменений НК при ХАН IV ст.

Степень вовлечения сегментов НК в трофические изменения	Число наблюдений с трофическими нарушениями НК в группах		Всего
	КлТ	плацебо	
один палец	6		6
два и более пальцев	2	2	4
все пальцы/дистальная треть стопы	1		1
пяточная область	1	1	2
вся стопа и/или голень	4	1	5

У всех пациентов сохранялась пульсация на ОБА. На ПкА, артериях стоп определить пульсацию не удавалось. Показатель ЛАД у всех больных колебался в пределах 25-70 мм рт. ст., в среднем составив 44,5 мм рт. ст. (у трех больных не удалось лоцировать переднюю и заднюю большеберцовые артерии (ПББА и ЗББА), дважды не обнаружена одна из этих артерий).

По данным МСКТ-ангиографии, у всех пациентов ОБА и ГБА оказывались проходимыми. В то же время ПБА или ПкА – окклюзированы. На голени, как правило, выявлялись одна или две функционирующие артерии, чаще всего с диффузными изменениями стенок на всем протяжении сосудов.

Локальных или общих патологических реакций при имплантации МККМ и плацебо ни у одного из пациентов не отмечалось.

Клинический эффект, если он имел место, наблюдался обычно не ранее 2-3 месяцев (иногда – еще позже) после трансплантации МККМ: снижалась интенсивность болей в НК в покое, увеличивалась ДБХ, начинали заживать трофические язвы (дефекты), отторгаться и эпителизоваться участки некроза. В целом процесс стабилизации состояния больных пациентов по состоянию кровоснабжения НК занимал от 6 до 12 мес.

В случае отсутствия эффекта от КлТ у пациентов сохранялись боли в покое, локально нарастали трофические изменения, ощутимо усиливались явления общей интоксикации, что в конце концов обуславливало необходимость осуществления АНК.

Сведения о клинически значимых событиях, отмечаемых у пациентов после проведения КлТ, представлены в таблице 8.

Таблица 8

Клинически значимые тенденции, констатируемые в состоянии
пациентов-участников, в исследовании эффективности КлТ

Негативные события	Число событий у пациентов групп (КлТ/Плцб) в течение							Всего
	1 мес.	6 мес.	1 года	2 лет	3 лет	4 лет	5 лет	
ампутация нижней конечности	6 / 2	1 / -	1 / -	1 / -				9 / 2

Негативные события	Число событий у пациентов групп (КлТ/Плцб) в течение							Всего
	1 мес.	6 мес.	1 года	2 лет	3 лет	4 лет	5 лет	
смерть прогнозируемая				1 / -	- / 1	1 / -		2 / 1
внезапная		4 / -		1 / -				5 / -
необходимость реваскуляризации НК как операции отчаяния	1 / -	1 / -		1 / -	2 / 1		1 / -	6 / 1
Всего	7 / 2	6 / -	1 / -	4 / -	2 / 2	1 / -	1 / -	22 / 4

Анализ результатов оказания МП пациентам КлТ-группы позволяет констатировать, что улучшение клинической картины (уменьшение интенсивности болей в НК в покое, увеличение ДБХ) наступало только в случаях диагностики у пациентов III стадии ишемии НК по Покровскому-Фонтейну – всего у 14 (38,9%) больных. Эффект улучшения сохранялся в течение 1-3,5 лет после пересадки МККМ.

У 15 больных КИНК из КлТ-группы явления ишемии НК не купировались, в связи с чем в сроки от 1 до 6 мес. после трансплантации МККМ в 7 случаях выполнена АНК. Двум пациентам в течение 6 мес. после введения МККМ выполнены профундопластика и аутовенозное бедренно-подколенное шунтирование как операции отчаяния, осуществление которых, несмотря на выраженное атеросклеротическое поражение артерий голени, завершилось определенным клиническим успехом.

В течение 5 лет после трансплантации МККМ АНК выполнены еще 3 пациентам. Усугубление явлений ишемии НК у 4 пациентов обусловило необходимость осуществить попытку хирургической реваскуляризации ног как операции отчаяния. Данные этих пациентов, согласно условиям протокола проведения исследования, из дальнейшего анализа были исключены.

В первые 6 мес. после проведения сеансов КлТ летальные исходы констатированы у 4 пациентов, через 2 года смерть наступила еще в одном случае. У двух пациентов в сроки 24-48 мес. уже после имплантации МККМ выявлены злокачественные новообразования.

Распределение клинически значимых событий после выписки пациентов из стационара представлено на рисунке 2.

Рис. 2. Распределение клинически значимых оценочных событий после имплантации МККМ

Через 12 мес. после трансплантации среди больных КЛТ-группы (21) значимое (почти в 2 раза) увеличение ЛАД констатировано только в одном наблюдении, у других пациентов оно оставалось на уровне, близком к исходному: среднее значение ЛАД у 17 чел. составило 54,3 мм рт. ст., у трех больных ЛАД определить не удалось.

Спустя 5 лет после трансплантации МККМ показатель ЛАД у пациентов (14) сохранялся на уровне выше исходного в одном случае, и еще в одном его значение было несколько ниже в сравнении с исходным показателем (до введения МККМ). У 12 больных уровень ЛАД оставался практически неизменным.

Изучение особенностей течения патологического процесса у больных, получавших плацебо, позволяет констатировать благополучие после выписки у 13 (76,5%) больных. Среди признаков благополучия: некоторое уменьшение интенсивности болей в НК в покое (в 9 случаях). Полученный эффект после введения плацебо сохранялся в сроки от 3 мес. до 2 лет.

Без изменений состояние пациентов констатировано у 8 больных, получавших плацебо. Еще у трех пациентов явления ишемии НК нарастали, в связи с чем в течение 1 мес. двум больным выполнена АНК. Через 3 года у одного пациента осуществлена реваскуляризация НК, с положительным эффектом. В одном случае через 36 мес. констатирован летальный исход. Распределение клинически значимых событий у больных, получавших плацебо, представлено на рисунке 3.

Рис. 3. Клинически значимые события в группе пациентов с КИНК, получавших при консервативном лечении плацебо

Динамика изменений ЛАД у больных Плцб-группы сопоставима с аналогичным показателем КлТ-группы: через 12 мес. после процедуры трансплантации МККМ уровень ЛАД был близким к исходному и колебался в пределах 47-95 мм рт. ст., в среднем составив 63,8 мм рт. ст.

При повторной (контрольной) МСКТ-ангиографии НК, выполненной 10 пациентам (по 5 наблюдений в группах КлТ и Плцб соответственно), явных изменений в состоянии сосудистого русла после введения МККМ или их имитации в сравнении с данными исходной ангиографической картины не обнаружено.

С целью выяснения причины неоднозначных результатов КлТ проведена оценка ангиорегенераторного потенциала клеток КМ у всех больных КИНК, включенных в исследование. В качестве контроля использованы данные об ангиогенном потенциале МККМ 46 здоровых доноров крови.

Прежде всего оценивалось количество образованных колоний Хилла как одного из индикаторов уровня первичного иммунного ответа, необходимого для регенерации, в том числе и в плане ангиогенеза.

Количество колоний Хилла у больных КИНК колебалось в пределах 10-20, в среднем составив 17,3. При оценке аналогичного показателя у здоровых людей их среднее количество составило 45,4 (диапазон его значений колебался в пределах 35-52). Такое значимое различие колониобразующего потенциала, вероятно, допустимо связывать со снижением функциональной активности клеток КМ больных КИНК или с ограниченным участием клеток, способных образовывать колонии Хилла. На основании данных об уменьшении потенции к колониобразованию можно также предполагать снижение уровня первичного

иммунного ответа (моноцитарного, нейтрофильного), что важно для стимуляции регенерации, в том числе ангиогенеза.

Еще одна часть исследования – сравнительная оценка ангиогенного потенциала субпопуляций клеток CD14⁺ и CD14⁻ ПК и КМ пациентов с КИНК и здоровых доноров посредством выявления потенциала образования этими ГК трубочек при культивировании с различными кондиционированными средами. Среднее количество фокусов эндотелиальных трубочек, формируемых при культивировании в средах, полученных от CD14⁺ клеток пациентов с КИНК, составило 10, от CD14⁻ клеток – 12, т.е. значимые различия между субпопуляциями отсутствовали. Вероятно, это может обуславливаться изменениями еще на стадии клеток-предшественниц (более ранних, чем общий миелоидный предшественник). Для контроля использована некондиционированная среда, в которой среднее количество фокусов эндотелиальных трубочек составило 30. Очевидно, клетки КМ больных КИНК мало способны стимулировать образование трубочек в матриксе с эндотелиальными клетками, что может быть обусловлено как особенностями используемой методики исследования, так и состоянием организма пациентов с КИНК.

Третья часть исследования посвящалась определению продукции секретируемых проангиогенных ростовых факторов ГК. Анализ данных об их уровне позволяет считать, что клетки популяции CD14⁺ выделяют большее количество VEGF (81 и 46 пг/мл, соответственно), а клетки CD14⁻ – HGF (86 и 52 пг/мл соответственно) и bFGF (32 и 5 пг/мл соответственно) (рисунок 4).

Рис. 4. Уровни концентрации ангиорегенераторных факторов, секретируемых субпопуляциями клеток больных КИНК

Полученные результаты могут оказаться полезными при проведении последующих исследований в отношении ангиорегенераторной значимости (способности) и других популяций клеток, которые, вероятно, можно будет применять в комплексе КЛТ ишемии НК

различного генеза. Регенерация сосудов – сложный процесс, в который вовлечены как собственно эндотелиальные клетки, так и окружающие их перициты, резидентные мезенхимальные стволовые клетки (МСК) и множество других клеток. Указанные популяции клеток выделяют различные активные молекулы и входят в сложные звенья регуляции физиологического баланса сосудов. Вероятно, исследования по использованию в будущем пригодного субстрата для КЛТ будут сопряжены с оценкой комбинаций разных типов клеток.

Обсуждение. За последние десятилетия в медицинской литературе опубликовано множество данных о результатах лечения больных патологией периферических артерий с использованием МККМ. В большинстве публикаций, посвященных КЛТ при ХИНК, авторы сообщают об эффективности этого способа лечения, и, что особенно важно, нередко это отмечается в отношении больных с явно негативным прогнозом течения заболевания [10]. Однако в работах некоторых исследователей эффективность использования МККМ в лечении больных КИНК подвергается сомнению [8]. При оценке результатов проведенного исследования следует принимать во внимание то обстоятельство, что больные КИНК – непростая категория пациентов с выраженной коморбидностью (сопутствующие заболевания со стороны сердечно-сосудистой и нервной систем констатированы у 92,3 и 46,2% соответственно). Это обуславливает высокие риски неблагоприятных исходов в периоперационном и раннем послеоперационном периоде при их хирургическом лечении «традиционными» методами. Согласно «Национальным рекомендациям по ведению пациентов с заболеваниями артерий нижних конечностей» (2013) в случаях консервативного лечения больных шанс сохранения НК в течение 12 мес. составляет 45%, а АНК выполняются в 30% случаев. В 25% наблюдений констатируется летальный исход [1]. По результатам проведенного исследования, сохранить пациентам НК при состоянии КИ в сроки до 12 мес. удалось в 67% наблюдений КЛТ-группы (АНК осуществлена в 22% наблюдений, в 11% случаев наступила смерть). Следует отметить, что при констатации данного факта принимались во внимание сведения и о пациентах, которым после проведения КЛТ при нарастании ишемии НК как операции отчаяния выполнены реваскуляризации НК, клинически сопровождавшиеся позитивным трендом. Результаты лечения этой группы обнадеживают, поскольку при традиционной тактике лечение больных КИНК, как правило, сопряжено с необходимостью выполнения АНК проксимальнее коленного сустава. Пациентам, которым проведен курс КЛТ, в анамнезе 41 раз выполнены хирургические пособия на сосудах пораженной НК, оказавшиеся неэффективными. Тем не менее тенденция позитивных результатов использования КЛТ констатирована более чем в половине наблюдений пациентов. При этом констатировано, что выраженность ишемии НК по

Покровскому-Фонтейну снижалась с уровня III до IIa-IIб степени.

Особое внимание обращает на себя еще одно обстоятельство: успешность использования КЛТ, хотя и на небольшом числе наблюдений, отчасти оказалась сравнимой с эффектом от хирургических реконструкций в бедренно-подколенном (тибиальном) сегменте.

Улучшение клинической ситуации (если оно имело место) в целом удавалось констатировать через 2-3 месяца (реже – дольше) от момента трансплантации клеток.

Нельзя не отметить, что особенности клинического течения болезни определенно коррелировали с направленностью эффекта КЛТ. Если в первые месяцы после трансплантации МККМ у пациентов не было отрицательной динамики (более того, если в этот период боли в покое возникали у пациентов несколько реже, меньше становилась их интенсивность, увеличивалась ДБХ и т.п.), рассчитывать на успех лечения можно было с определенным оптимизмом. В тех случаях, когда в течение этого срока констатировалось ухудшение клинической картины, вероятность позитивного исхода оказывалась низкой, и в этих случаях рано или поздно пациентам приходилось осуществлять АНК.

Уровень ЛАД, по мнению ряда авторов, – достоверный показатель вектора течения КИНК [9]. Однако клинически регистрируемое улучшение не всегда совпадало с ростом регионарного АД. В тех случаях, когда констатировалось отсутствие лечебного эффекта от трансплантации МККМ, ЛАД также не имело тенденции к повышению. Особенно отчетливо это отмечается у больных с IV стадией ишемии НК по Покровскому-Фонтейну. Улучшение местной гемодинамики (если оно имело место) в основном регистрировали через 2-3 месяца после введения МККМ. Среди 21 случая лечения больных посредством КЛТ, у которых в первые 12 мес. отмечено клиническое улучшение, рост ЛАД зарегистрирован только у 3 пациентов, значимое его увеличение констатировано у одного больного. Отсутствие корреляции между клиническим улучшением состояния пациентов с увеличением ЛАД констатируется и рядом других авторов [8; 12]. R.W. Franz et al. (2009), анализируя результаты клеточной терапии ХИНК по данным десяти публикаций других авторов, показал, что повышение ЛПИ более чем на 0,1 в этих работах отмечено в 12,5–92% случаев [17].

В 10 наблюдениях при КТ-ангиографии артерий пораженных НК в отдаленные сроки наблюдения после введения МККМ не выявлено какой-либо динамики в состоянии магистральных артерий или их коллатералей. Судя по данным литературы, рост числа коллатералей (их более «плотное» контрастирование) также регистрируется далеко не всегда. В этой связи В. Amann et al. (2009) [18] на основании данных о повторном ангиографическом обследовании нескольких больных отказались от выполнения этой процедуры у большинства своих пациентов.

Факт того, что при четком представлении о течении заболевания по клинической картине после введения МККМ результаты используемых инструментальных методик могут не соответствовать данным клинического обследования, несколько смущает. В частности, наблюдаемые улучшения могут не подтверждаться, например, ростом показателя такого важного индикатора состояния кровотока пораженной НК, как уровень лАД.

Объясняя механизмы действия МККМ в данных ситуациях, очевидно, можно допустить, что у ряда пациентов с увеличением лАД отмечается доказанное улучшение перфузии дистальных отделов НК. Вероятно, это связано с перекалибровкой артериальных коллатералей, сопровождающей КИ и стимулируемой МККМ.

В работах ряда авторов подробно рассмотрены схема ангиогенеза и звенья этого процесса. В частности, в обзоре литературы Н. Zawall (2010) эффект клеточной терапии, связанный с появлением в тканях НК новых очень мелких сосудов, как это представлялось прежде [19], аргументированно отвергается [20].

Вопрос об отсутствии корреляции клинических данных и результатов объективной оценки регионарного кровообращения у больных КИНК в публикациях компетентных специалистов обсуждается лишь косвенно. Некоторые авторы считают, что, регистрируя АД только в магистральных артериях НК, невозможно получить истинное представление о состоянии кровотока в них из-за того, что стенки этих магистралей оказываются выражено измененными, и данные традиционно используемых методик оценки гемодинамики не могут отражать обновленный уровень общей перфузии дистальных отделов НК после перекалибровки артериальных коллатералей [21]. Эти же исследователи полагают, что более продолжительное наблюдение за пациентами, чем в анализируемых случаях, позволит чаще регистрировать рост лАД.

Таково, в общем ракурсе, в настоящее время наиболее распространенное объяснение причин расхождения в данных клинической оценки и объективного исследования состояния кровообращения в НК после лечения пациентов с КИНК посредством трансплантации МККМ. Однако ряд авторов приводит сведения о множестве возможных паракринных эффектов, обусловленных, как считается, специфическими свойствами стволовых клеток [22]. Результаты этих исследований наводят на мысль о том, что трансплантация МККМ в конечном счете, возможно, обуславливает не только перекалибровку артерий, несущих кровь к дистальным отделам НК, но и оказывает протективный эффект, влияя на состояние кислородного обмена в тканях.

Еще одним из вопросов, возникающих при анализе результатов применения МККМ у больных КИНК, оказывается желание понять причины отсутствия в части наблюдений эффекта КЛТ. Гипотетически в качестве причины неудач можно предполагать

относительную запоздалость лечения больных КИНК технологиями КЛТ. Не исключено, что «потенциальные возможности» МККМ у разных индивидуумов отличаются. Но объективность этих предположений требует проведения специальных исследований.

Наконец, особый интерес ангиологов заключается в определении предпочтительного варианта КЛТ, прежде всего в плане использования МККМ или МСК. По данным источников литературы, эффект в обоих случаях почти идентичен. Однако при использовании МСК на начальном этапе КЛТ требуется не более 20 мл КМ с забором биоматериала под местной анестезией. В то же время процедуры культивирования СК осуществляются не менее 3 недель, что иногда совершенно неприемлемо в плане оказания больному тяжелой ишемией НК МП надлежащего качества. Для осуществления КЛТ мононуклеарами КМ забирается в объеме от 100 до 400 мл под общим или местным обезболиванием. Однако трансплантация клеточных материалов проводится в день их приготовления. Данные исследователей о достоинствах и недостатках этих вариантов КЛТ противоречивы.

Заключение. Таким образом, можно констатировать, что когда лечебные возможности т.н. традиционных методов оказываются исчерпанными, посредством трансплантации МККМ у больных КИНК оказывается возможным воздержаться от АНК более чем в половине случаев. Трансплантация МККМ не приводит к каким-либо тяжелым осложнениям, что убеждает в ее безопасности. При тщательной формулировке показаний к выполнению КЛТ она оказывается эффективным средством в оказании МП больным терминальными стадиями ишемии НК. Вместе с тем в настоящее время применение клеточных технологий при лечении больных КИНК масштабно осуществляется лишь в некоторых медицинских исследовательских центрах, нередко – в качестве апробаций или пилотных проектов, без широкого распространения, а оптимизм в лечении больных КИНК посредством КЛТ во многом определяется только результатами многочисленных экспериментальных исследований *in vitro*. Многие механизмы регенерации сосудистого русла под воздействием МККМ и МСК остаются неясными. Указанные обстоятельства побуждают к необходимости дальнейшего изучения свойств МККМ при лечении пациентов с терминальной ишемией НК.

Список литературы

1. Национальные рекомендации по ведению пациентов с заболеваниями артерий нижних конечностей (Российский согласительный документ) // Ангиология и сосудистая хирургия. 2013. Т. 19. № 2. 68 с.
2. Сосудистая хирургия: национальное руководство / под ред. В.С. Савельева, А.И.

Кириенко; краткое издание. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. 464 с.

3. Покровский А.В., Казаков Ю.И., Лукин И.Б. Критическая ишемия нижних конечностей. Инфраингвинальное поражение. Тверь: Ред.-изд. центр Твер. Гос. ун-та, 2018. 225 с.
4. Казаков Ю.И., Лукин И.Б., Соколова Н.Ю., Страхов М.А. Оценка хирургического риска у больных с хронической критической ишемией нижних конечностей // Ангиология и сосудистая хирургия. 2016. Т. 22. № 3. С. 139-144.
5. Biancari F. Meta-analysis of the prevalence, incidence and natural history of critical limb ischemia. J Cardiovasc Surg (Torino). 2013. Vol. 54. no. 6. P. 663-669.
6. Kret M.R., Perrone K.H., Azarbal A.F., Mitchell E.L., Liem T.K., Landry G.J., Moneta G.L. Medical comorbidities but not interventions adversely affect survival in patients with intermittent claudication. J. Vasc. Surg. 2013. Vol. 58. no. 6. P. 1540-1546.
7. Сорока В.В. Ампутация нижней конечности в лечении больных с критической ишемией // Ангиология и сосудистая хирургия. 2010. Т. 16. № 4. С. 329-330.
8. Лебедев С.В., Карасев А.В., Кунгурцев В.В., Лохонина А.В., Клейменова Е.Б. Клеточная терапия критической ишемии нижних конечностей (проблемы и перспективы) // Вестник Российской академии медицинских наук. 2013. Т. 68. № 3. С. 33-44.
9. Суковатых Б.С., Орлова А.Ю. Стимуляция ангиогенеза клетками костного мозга при экспериментальной ишемии конечности // Ангиология и сосудистая хирургия. 2017. Т. 23. № 1. С. 43-50.
10. Капутин М.Ю., Бурнос С.Н. Применение стволовых клеток для лечения больных с критической ишемией нижних конечностей // Вестник хирургии имени И.И. Грекова. 2015. Т. 174. № 1. С. 103-108.
11. Das A.K., Bin Abdullah B.J., Dhillon S.S., Vijanari A., Anoop C.H., Gupta P.K. Intra-arterial allogeneic mesenchymal stem cells for critical limb ischemia are safe and efficacious: report of a phase I study. World J. Surg. 2013. P. 37. no. 4. P. 915-922.
12. Kondo K., Yanishi K., Hayashida R., Shintani S., Shibata R., Murotani K., Ando M., Mizuno M., Fujiwara T., Murohara T., Matoba S. Long-Term Clinical Outcomes Survey of Bone Marrow-Derived Cell Therapy in Critical Limb Ischemia in Japan. Circ. J. 2018. Vol. 82. no. 4. P. 1168-1178.
13. Lu D., Chen B., Liang Z., Deng W., Jiang Y., Li S., Xu J., Wu Q., Zhang Z., Xie B., Chen S. Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: A double-blind, randomized, controlled trial. Diabetes research and clinical practice. 2011. Vol. 92. № 1 P. 26-36.
14. Walter D.H., Krankenberg H., Balzer J.O., Kalka C., Baumgartner I., Schlüter M., Tonn T., Seeger F., Dimmeler S., Lindhoff-Last E., Zeiher A.M. Intraarterial Administration of Bone

Marrow Mononuclear Cells in Patients With Critical Limb Ischemia : A Randomized-Start, Placebo-Controlled Pilot Trial (PROVASA). *Circ. Cardiovasc. Interv.* 2011. Vol. 4. P. 26-37.

15. Биологические резервы клеток костного мозга и коррекция органных дисфункций / Под ред. В.И. Шумакова, Н.А. Онищенко. М.: Лавр, 2009. 308 с.

16. Hill J.M., Zalos G., Halcox J.P., Schenke W.H., Waclawiw M.A., Quyyumi A.A., Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *New Engl. J. Med.* 2003. Vol. 348. P. 593-600.

17. Franz R.W., Parks A., Shah K.J., Hankins T., Hartman J.F., Wright M.L. Use of autologous bone marrow mononuclear cell implantation therapy as a limb salvage procedure in patients with severe peripheral arterial disease. *J. Vasc. Surg.* 2009. Vol. 50. no. 6. P. 78-90.

18. Amann B., Luedemann C., Ratei R., Schmidt-Lucke J.A. Autologous bone marrow cell transplantation increases leg perfusion and reduce amputations in patients with advanced critical limb ischemia due to peripheral artery disease. *Cell Transplantation.* 2009. Vol. 18. P. 371-380.

19. Sprengers R.W. Moll F.Z., Verhaar M.C. Stem cell therapy in PAD. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2010. Vol. 39. Suppl 1. P. 38-43.

20. Zawall H., Bramlage P., Amann B. Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. *Thrombosis and Haemostasis.* 2010. Vol. 103. no.4. P. 696-709.

21. Gu Y.Q., Zhang J., Guo L.R., Qi L.X., Zhang S.W., Xu J., Li J.X., Luo T., Ji B.X., Li X.F., Yu H.X., Cui S.J., Wang Z.G. Transplantation of autologous bone marrow mononuclear cells for patients with lower limb ischemia. *Chin. Med. J.* 2008. Vol. 121. no. 11. P. 963-967.

22. Gneccchi M., Zhang Z., Ni A., Dzau V.J. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res.* 2008. Vol. 103. no. 11. P. 1204-1219.